

## بررسی اثر غلظت‌های گوناگون کلرید جیوه بر مراحل تکوین جنین ماهی سفید (*Rutilus frisii kutum*) دریای خزر

خدبچه محمدیان ساروی\*<sup>۱</sup>، مهرانگیز صدوقی<sup>۲</sup>، همایون حسین زاده صحافی<sup>۳</sup>، سید هادی موسوی<sup>۴</sup>

۱- دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، دانشکده علوم زیستی، گروه زیست‌شناسی، تهران، ایران، صندوق پستی: ۱۶۶۷۹۳۴۷۸۳

۳- موسسه تحقیقات شیلات، تهران، ایران، صندوق پستی: ۱۴۱۵۵-۶۱۱۶

۴- مرکز تکثیر و بازسازی آبزیان شهید رجایی، ساری، ایران، صندوق پستی: ۸۳۳

تاریخ پذیرش: ۲۱ اردیبهشت ۱۳۹۲

تاریخ دریافت: ۲۳ بهمن ۱۳۹۱

### چکیده

امروزه اثر آلاینده‌ها بر روند تکوین جنینی به ویژه آبزیان به اثبات رسیده است. این پژوهش با هدف بررسی اثرات سمیت کلرید جیوه بر مراحل تکوین جنین ماهی سفید (*Rutilus frisii kutum*) صورت پذیرفت. این تحقیق در شرایط آزمایشگاهی مرکز تکثیر و پرورش ماهی سفید شهید رجایی ساری در سال ۱۳۹۰ طی دو مرحله انجام شد. مرحله اول به مدت ۹۶ ساعت، برای تعیین سمیت کلرید جیوه ( $LC_{50}$ ) با ۵ تیمار با غلظت‌های ۲۰، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میکروگرم در لیتر و تیمار شاهد (بدون کلرید جیوه). اثر غلظت‌های مختلف کلرید جیوه بر مراحل رشد و نمو جنینی در ۳ تکرار انجام شد. میزان ( $LC_{96\ h}$ ) بر جنین ماهی سفید  $102/41$  میکروگرم در لیتر تعیین شده است. مرحله دوم در مدت ۷ روز: به منظور بررسی میزان تاثیر کلرید جیوه بر مراحل ارگانوژنز جنین در غلظتی کمتر از (غلظت‌های کشنده  $50\% \text{ LC}_{50}$ ) با ۳ تیمار (۲۰، ۵۰ و ۱۰۰) میکروگرم در لیتر کلرید جیوه و تیمار شاهد، در ۳ تکرار انجام شد. با بررسی مراحل جنینی و روش تحلیل آماری در تیمار  $20\ \text{ppb}$ ، کلرید جیوه محلول در آب سبب تاخیر در مراحل تکامل و کاهش رشد در جنین گردید و میزان مرگ و میر  $6/25\%$  ثبت گردید و ایجاد ( $3-7/5$ ) آنورمالی در اندام‌ها شامل، خمیدگی در ناحیه دم و ستون فقرات مشاهده گردید. در تیمار  $50\ \text{ppb}$  کلرید جیوه محلول در آب افزایش مرگ و میر حدود  $30/25\%$  و در تیمار  $100\ \text{ppb}$  کلرید جیوه  $49/5\%$  میزان ناهنجاری در تیمار  $50\ \text{ppb}$  کلرید جیوه  $38/9\%$  و در تیمار  $100\ \text{ppb}$  کلرید جیوه  $53/9\%$  بود. آنورمالی در اندام‌های جنین مانند خمیدگی در ناحیه دم و ستون فقرات و ادم در کیسه زرده مشاهده شد.

**کلمات کلیدی:** ماهی سفید، کلرید جیوه، جنین ماهی، ارگانوژنز.

## مقدمه

در تکثیر و پرورش ماهی، محیط‌های پرورش و کیفیت آب از عناصر تعیین‌کننده‌ای هستند که میزان بازماندگی لاروها و درصد بقای ماهی را تضمین می‌کند (Behra, 1993).

پیشرفت صنایع و افزایش بی‌رویه جمعیت سبب شده است تا فاضلاب‌های صنعتی و شهری و پساب‌های کشاورزی که دارای ترکیبات شیمیایی مختلفی، از قبیل عناصر سنگین هستند، وارد اکوسیستم آبی شده و به عنوان یک مسأله مهم و حتی خطرناک مطرح شوند، زیرا که در اکوسیستم‌ها تجزیه و حذف نمی‌شود (Guliherm, et al., 2008).

در بین فلزات سنگین، جیوه فلزی منحصر به فرد است که در طبیعت دارای اشکال فیزیکی و شیمیایی مختلفی می‌باشد. با توجه به ماهیت شیمیایی جیوه و زمان قرار گرفتن در معرض این فلز میزان تأثیرات جیوه بر موجود زنده متغیر است (Weis, 1997). فاضلاب‌های صنعتی که وارد رودخانه‌ها و دریا می‌شوند حاوی ترکیبات مختلفی از جیوه می‌باشند. جیوه و ترکیبات آن منجر به آلودگی آب شده و اثرات مختلفی در ماهی ایجاد کرده که غلظت مشخصی از آن نهایتاً مرگ ماهی را موجب می‌شود. شناسایی آلاینده‌ها و اثر آن بر مکانیسم‌های فیزیولوژیکی از مسائل مهم علم توکسیکولوژی به شمار می‌رود.

اطلاعات حاصل از آزمایشات سم‌شناسی در علم اکوتوکسیکولوژی تأثیرات این سموم را در مراحل مختلف زندگی بر جمعیت ماهیان آب شیرین و دریا نشان داده است و به این ترتیب می‌توان تعیین نمود که پتانسیل کدامیک از موارد آلاینده بیشتر و در چه میزان

از حد مجاز مصرف قرار دارد (Devlin, Cavas, 2008; 2006; Diajomanolin, 2004; Dave, 1991; Westernhang, 1970; Weis, 1977). مراحل اولیه زندگی از مهمترین مراحل برای جمعیت ماهی است که در این دوران (جنینی و لاروی) به شدت احتمال مرگ وجود دارد. در این مراحل جنین ماهی به تغییرات محیطی و فعالیت‌های انسانی از قبیل قرار گرفتن در محیط جیوه‌دار بسیار حساس است (Perry, 1988; Chow, 2003).

مطالعات انجام شده نشان می‌دهد که ترکیباتی از جیوه که به دریا حمل می‌شوند به صورت‌های مختلف بر روی لارو و جنین‌ها تأثیر می‌گذارند مانند: ۱- گسستگی غشاء زرده‌ای (پوسته شدن) ۲- کم شدن مرحله تفریخ و یا تاخیر در آن ۳- کاهش بقاء و زنده ماندن ۴- آنورمالی در اندام‌های مختلف جنین و لارو ۵- مهار فعالیت آنزیم‌ها ۶- آنورمالی کروموزم‌ها و دیگر مشکلات فیزیولوژی و ژنتیکی (Cavas, 2008; Chow, 2003; Heath, 1995; Kapur, 1982; Perry, 1988; Werlecar, 2008; Westernhang, 1970).

دریای خزر و رودخانه‌های اطراف آن محل ورود پساب‌های کارخانجات می‌باشد (شهریاری مقدم، ۱۳۸۷) و از طرفی این منطقه محل تخم‌ریزی یا زمستان‌گذرانی برخی ماهیان از جمله ماهی سفید است. با توجه به اینکه مراحل جنینی ماهی از مراحل حساس به مواد آلاینده موجود در آب است می‌توان از آن به عنوان شاخص حساس برای ردیابی تأثیرات سمی جیوه در اکوسیستم‌ها استفاده شود. بنابراین بررسی تأثیر جیوه و ترکیبات آن بر مراحل رشد و نمو جنینی ماهی سفید به عنوان یک نمونه تجاری و اقتصادی حائز اهمیت است.

دمای محیط آزمایشگاه ۱۵±۱ درجه سانتی‌گراد و ۱۳ ساعت در محیط روشنایی و ۱۱ ساعت تاریکی بود.

در این تحقیق با هدف بررسی، ۲ دسته تست سمیت کلرید جیوه بر روی جنین ماهی سفید به شرح زیر به اجرا درآمد.

- ۱- تست سمیت حاد (۹۶ h) که تعیین غلظت یا تعیین مرگ ۵۰٪ از جنین‌ها
- ۲- تست سمیت برای شناسایی تأثیر جیوه روی آنورمالی اندام‌ها- بقاء و رشد جنین‌ها

### مواد و روش‌ها

مواد شیمیایی و لوازم مورد نیاز

در این تحقیق از ترکیب شیمیایی کلرید جیوه، تخم ماهی سفید، آکواریوم (وسایل جانبی مانند سنگ هوا و پمپ‌هوا)، ترازوی حساس با دقت ۰/۰۰۰۱ گرم، pH سنج شرکت Horiba ساخت آلمان، استریو فتومیکروسکوپ مدل Nikon-SMZ1000, japon، ارلن‌مایر استفاده شد.

تست اول: تعیین سمیت حاد کلرید جیوه (LC50) بر روی جنین ماهی سفید

تخم‌های لقاح یافته ماهی سفید از مرکز پرورش ماهی سفید شهید رجایی ساری تهیه و آزمایش‌ها انجام شده طبق روش O.E.C.D. (۱۹۹۸) انجام شد. در این روش آزمایش‌ها به صورت ساکن (static) بوده و در آن محلول آزمایش در طول انجام آزمایش ثابت می‌باشد. در تمام مدت آزمایش، فاکتورهای فیزیکی، شیمیایی و pH، حرارت و میزان اکسیژن بررسی شده است (جدول ۱).

جدول ۱: فاکتورهای فیزیکی و شیمیایی آب

پارامتر	مقدار
درجه‌ی حرارت	۱۵±۱ درجه‌ی سانتی‌گراد
اکسیژن محلول	همواره بیشتر از ۵ میلی‌گرم /لیتر
PH	۷/۴۵۶±۰/۱۳۵
EC	۰/۳۵۷۵±۰/۰۲۰۵ میکروموس /سانتی متر
سختی کل	۵۶ میلی‌گرم /لیتر کربنات کلسیم
قلیائیت کل	۱۲۵/۳۳ میلی‌گرم /لیتر
فسفات	۰/۸۵ میلی‌گرم /لیتر
نترات	۸/ ۴۳ میلی‌گرم /لیتر
نیتريت	۰/۸۶ میلی‌گرم /لیتر

تخم‌های لقاح یافته ماهی سفید، به گروه‌های ۲۰ تایی و هر گروه در یک لیتر آب و در معرض غلظت‌های مختلف کلرید جیوه قرار گرفتند. ظروفی که غلظت کلرید جیوه در آن برابر صفر بود، به عنوان شاهد در نظر گرفته شد. به بقیه ظروف یعنی گروه‌های تیمار به ترتیب غلظت‌های ۲۰، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰ میکروگرم کلرید جیوه به ازای هر لیتر آب اضافه شد. آزمایش در گروه‌های تیمار سه بار تکرار شد. طی دوره آزمایش، ظروف شیشه‌ای به طور یکسان هوادهی شدند.

ظروف شیشه‌ای، طی ۴ روز به صورت هر ۲۴ ساعت یکبار و رأس ساعت مشخص مورد بررسی قرار گرفته و مقدار مرگ و میر جنین ماهی‌ها ثبت شد (ناجی، ۱۳۸۶).

<sup>۱</sup> LC<sub>50</sub> = غلظتی از سم که در مدت ۹۶ ساعت سبب مرگ ۵۰٪ از

ماهی‌ها می‌شود

<sup>۲</sup> short-term toxicity test on embryo and = OECD sac-fry stages

نرم افزار فتوشاپ و vition axisio اندازه گیری طول نیز انجام شد.

### روش آماری

جهت تعیین سمیت کشنده از برنامه نرم افزاری SPSS روش آماری Probit Analysis نمودارها مورد تجزیه تحلیل قرار گرفت. جهت مشخص نمودن وجود و یا عدم وجود اختلافات معینی دار در میزان مرگ و میر و تغییرات طول جنین از تجزیه واریانس (ANOVA) و آزمون های LSD استفاده شد.

### نتایج

با انجام آزمایش های متعدد بر روی مراحل تکوین جنینی ماهی سفید، محدوده کشندگی کلرید جیوه بین (۱۰۰ تا ۱۵۰ میکروگرم در لیتر) تعیین شد. در نهایت آزمایش های اصلی در سه تکرار انجام و نتایج در هر ۲۴ ساعت در غلظت های مختلف (۲۰-۵۰-۱۰۰-۱۵۰-۲۰۰) و به مدت ۹۶ ساعت جنین های تلف شده شمارش و ثبت شد.

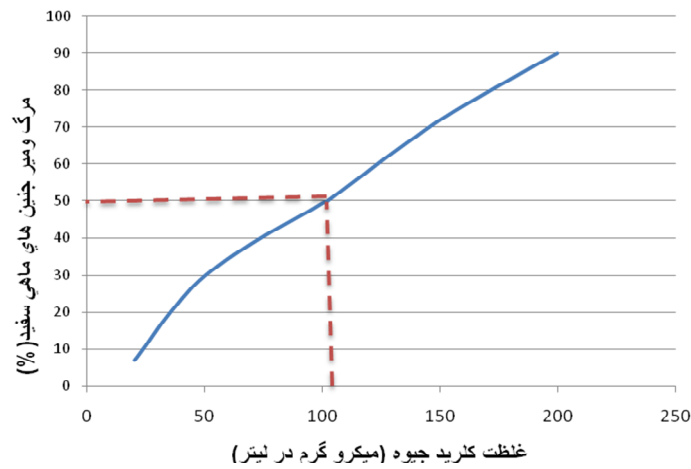
با تعیین میانگین تلفات در زمان های تعیین شده و با استفاده از معادله خط و رگرسیون و تعیین ضریب همبستگی بین غلظت و مرگ و میر در هر ۲۴ ساعت و با رسم نمودار LC<sub>50</sub>، در نهایت مقدار LC<sub>50</sub> در ۹۶ ساعت ۱۰۲/۴۱ میکروگرم در لیتر محاسبه و در جدول (۲) ثبت شد.

تست ۲: تست سمیت بر مورفولوژی در مدت ۷ روز جنینی ماهی سفید

تعداد ۲۴۰ تا از تخم های لقاح یافته را در ظروف شیشه ویس با غلظت های پایین تر از LC<sub>50</sub> (۲۰-۵۰-۱۰۰) قرار داده شد. آزمایش با ۳ تیمار و شاهد و هر مورد با ۳ تکرار انجام شد. مقدار حجم معین از غلظت های کلرید جیوه توسط پیپت برداشته و به ظروف شیشه ای با حجم ۱ لیتری آب شیرین اضافه شد. در هر آکواریوم ۲۰ عدد تخم لقاح یافته اضافه شد. طی دوره آزمایش، ظروف شیشه ای به طور یکسان هوادهی شدند. از هر یک از ظروف شیشه ای تا قبل از مرحله تفریح نمونه ها در زمان های مشخص جنینی ماهی سفید (بلاستولا، گاسترولا، اندام زایی، چشم زدن، چشم دار بهزادی، ۱۳۷۶) به طور تصادفی انتخاب شده و سپس توسط سوزن تشریح جنین از غشاء تخم خارج و یا تخم در اسیداستیک قرار داده و پس از شفاف شدن زرده، توسط لوب دوربین دار (Nicon-SMZ1000, japon) با بزرگنمایی ۱۰۰۰ مشاهده و عکس برداری انجام شده و برای مقایسه زمان مراحل جنینی اطلاعات به صورت جدول رسم می شود. در نهایت از جنین های باقی مانده در ظروف شیشه ای در مرحله چشم زده (روز ۷ جنینی)، جنین ها به صورت تصادفی انتخاب شده و پس از عکس برداری، نوع آنورمالی مشخص و با

جدول ۲: تعیین مقدار LC<sub>50</sub> در مدت ۹۶ ساعت

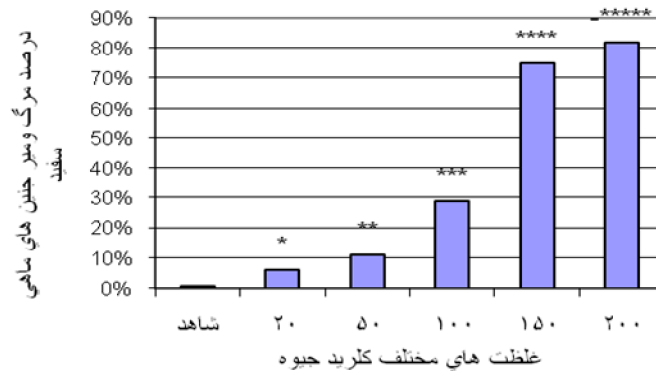
نام سم	غلظت کشنده میکرو گرم بر لیتر	۲۴ ساعت	۴۸ ساعت	۷۲ ساعت	۹۶ ساعت
کلرید جیوه	LC <sub>50</sub>	۱۸۲/۵۹۸	۱۲۳/۸۳۱	۱۰۹/۲۵	۱۰۲/۴۱



شکل ۱: میزان سمیت کشنده در ۵۰٪ جنین‌های ماهی سفید

و در غلظت ۵۰ میکروگرم در لیتر ۳۰/۲۵٪ جنین‌ها تلف شده و در غلظت، ۱۰۰ میکروگرم در لیتر ۴۹/۵٪ و در غلظت ۱۵۰ میکروگرم در لیتر ۷۵٪ و در غلظت ۲۰۰ میکروگرم در لیتر ۸۹/۵۵٪ از جنین‌ها تلف شده و سفید شدند.

تأثیر کلرید جیوه بر روی مرگ و میر جنین ماهیان در زمان‌های مختلف متفاوت بوده، به طوری که مرگ و میر جنین‌ها با افزایش زمان کاهش می‌یابد. در داخل ظروف شیشه‌ای شاهد پس از ۹۶ ساعت تعداد بسیار اندکی، تقریباً ۱٪ جنین تلف شده و سفید شدند. در غلظت ۲۰ میکروگرم در لیتر، ۶/۷۵٪ از جنین‌ها مردند

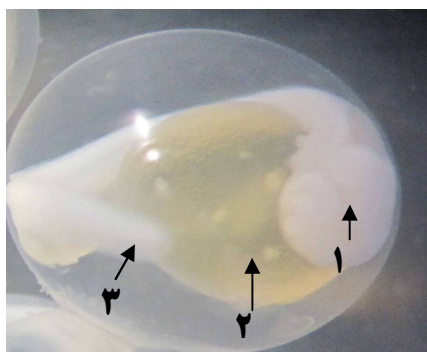


شکل ۲: تغییرات مرگ و میر جنین‌ها در غلظت

چشم، روز هفتم جنینی) نشان می‌دهد که کلرید جیوه سبب تاخیر در مراحل تکامل جنینی و به خصوص در مراحل اولیه (گاسترولا و اندام‌زایی) می‌شود.

۲- نتایج تست ۷ روزه  
نتایج حاصل از بررسی تصاویر ثبت شده در مراحل مختلف (مورولا گاسترولاسیون، اندام‌زایی، تشکیل

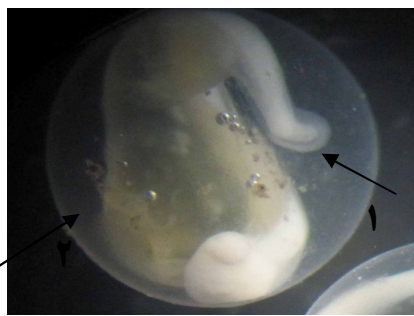
نتایج حاصل از بررسی ماکروسکوپی تیمارهای تحت تاثیر کلرید جیوه حاکی از وجود ناهنجاری های در جنین های تحت تاثیر بوده است. بطوری که پس از ۹۶ ساعت در جنین با غلظت ۲۰ نسبت به شاهد خمیدگی انتهایی دم و ادم کیسه‌ی زرده نسبت به گروه شاهد مشاهده شد (شکل ۵و۴).



شکل ۴: جنین شاهد ماهی سفید-در مرحله ۱۲(۹۶ساعته)

بزرگنمایی (X10)

۱-جام بینایی ۲- کیسه زرده ۳-انتهای دم



شکل ۵: جنین ماهی سفید ۲۰- در مرحله ۱۲(۹۶ساعته)

۱-خمیدگی انتهایی دم و ۲-ادم کیسه زرده-(X10)

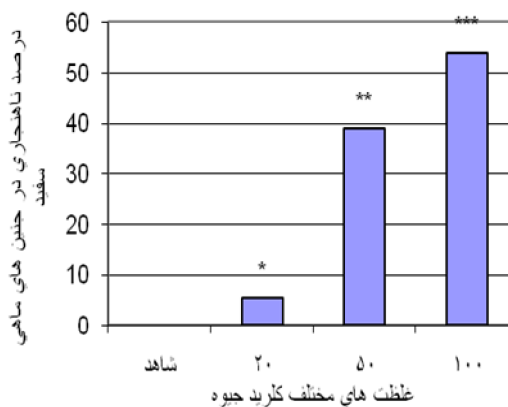
در عین حال وجود ناهنجاری در سایر دزها در زمان ۹۶ ساعته مشاهده گردید به طوری که با افزایش دزها ناهنجاری های همچون ادم کیسه‌ی زرده، عدم رشد دم، خمیدگی انتهایی دم دیده می شود (شکل ۶و۷).

همچنین با افزایش غلظت کلرید جیوه در جنین ها، میزان آنورمالی در اندام های جنین نیز افزایش می یابد. با توجه به نمودار (۳)، میزان آنورمالی در غلظت ۵۰ میکروگرم در لیتر حدود (۳۸/۹٪) و در غلظت ۱۰۰ میکروگرم در لیتر (۵۳/۹٪) اندازه گیری شد. آنورمالی در غلظت ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم در لیتر نسبت به گروه شاهد افزایش قابل توجهی دارد ( $p < 0/001$ ).

میزان آنورمالی در غلظت ۲۰ میکروگرم در لیتر حدود (۳-۷/۵٪) بوده که تفاوت قابل توجهی نسبت به گروه کنترل نشان داده نشد. با توجه به جدول (۲) بیشتر آنورمالی مشاهده شده در جنین ها شامل عدم تشکیل سر، خمیدگی انتهایی دم- بدشکلی ستون فقرات است.

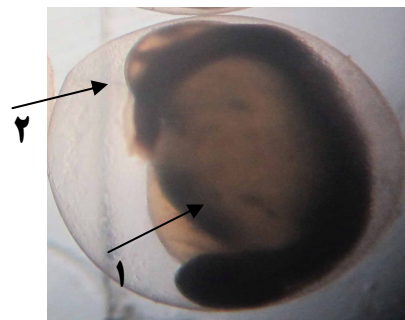
جدول ۳: ناهنجاری در غلظت های مختلف کلرید جیوه

شاهد	ناهنجاری دیده نشد
۲۰	جنین ها دارای خمیدگی دم و بد شکلی ستون فقرات
۵۰	خمیدگی دم- بد شکلی ستون فقرات - ادم در کیسه زرده
۱۰۰	بد شکلی بلاستو دیسک- کرانیو سفالی -خمیدگی دم- بد شکلی ستون فقرات -عدم تشکیل قلب

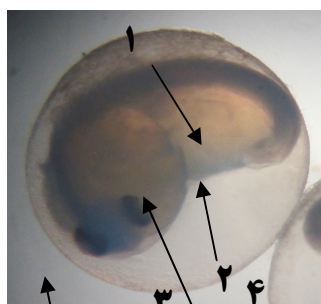


شکل ۳: تغییرات ناهنجاری با غلظت های مختلف کلرید جیوه

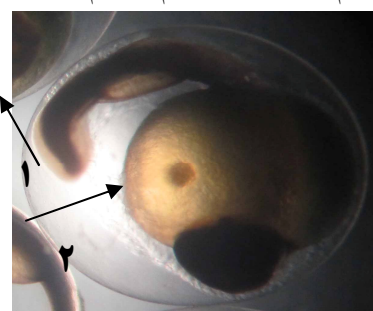
همچنین وجود ناهنجاری در دزهای ۵۰ و ۱۰۰ دیده شد به طوری که در دز ۵۰ در مرحله‌ی ۱۵ خمیدگی انتهای دم، عدم تشکیل دم و در جنین‌های دز ۱۰۰ در همین مرحله ناهنجاری چون عدم تشکیل قلب، ایراد در ستون فقرات در ناحیه‌ی دم و عدم تشکیل دم دیده می‌شود (شکل ۹، ۱۰ و ۱۱).



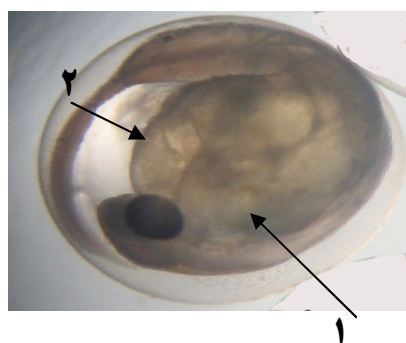
شکل ۶: تصویر از جنین ۵۰-در مرحله ۱۲ (۹۶ساعته) ۱-ادم کیسه زرده-۲-عدم رشد دم (X10)



شکل ۹: جنین ماهی سفید در ۵۰-در روز ۷ جنینی ۱-خمیدگی انتهای دم-۲-دم رشد نیافته-۳-ادم کیسه زرده-۴-سر کوچک (X10)

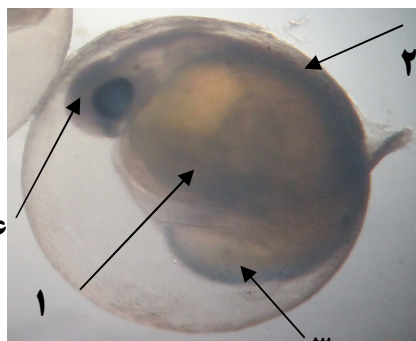


شکل ۷: جنین ماهی سفید در ۱۰۰-در مرحله ۱۲ (۹۶ساعته)، ۱-خمیدگی انتهای دم-۲-تاخیر در تشکیل سروجام بینایی (X10)

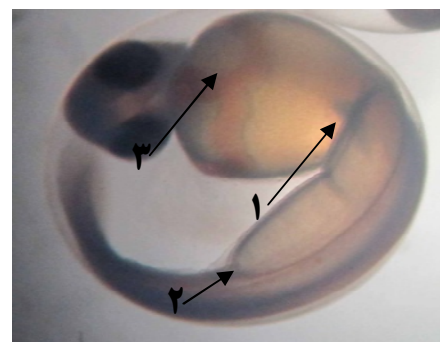


شکل ۱۰: جنین ماهی سفید در ۱۰۰-در مرحله ۱۵ (۷-۷.۵) ۱-عدم تشکیل قلب-۲-ایراد در ستون فقرات در ناحیه دم- (X10)

با بررسی‌های میکروسکوپی در روز ۷ (مرحله ۱۵ جنینی) از تیمارهای ۲۰ که تحت تاثیر کلرید جیوه قرار داشتند حاکی از وجود ناهنجاری‌های مانند خمیدگی انتهای دم و پیچش c شکل نسبت به جنین شاهد دیده شد (شکل ۸).



شکل ۱۱: جنین ماهی سفید در ۱۰۰-در روز ۷ جنینی ۱-عدم تشکیل قلب-۲-ایراد در ستون فقرات در ناحیه دم-۳-عدم تشکیل دم-۴-بد شکلی در سر- (X10)



شکل ۸: جنین شاهد ماهی سفید-در روز ۷ جنینی (X10) ۱-قلب مشخص-۲-دم رشد یافته-۳-چشم‌ها بایگمان‌های مشخص

افزایش نشر آلاینده‌ها در اکوسیستم‌ها می‌شوند (Diagomanolin, 2004).

آب‌های آلوده به مواد سنگین از جمله ترکیبات جیوه، تاثیرات نامطلوبی بر مراحل رشد و نمو جنین و لارو ماهی‌ها ایجاد می‌کند (Arabi, 2004). ترکیبات جیوه، سبب تغییرات زیان‌آور بر سیستم‌های بیولوژیکی (تنفسی، عصبی، ایمنی، تولید مثلی) و در نهایت افزایش مرگ و میر آبریان می‌شود (Verlecar, et al., 2008; Guilherme, et al., 2008; Dave and Xiu, 1991).

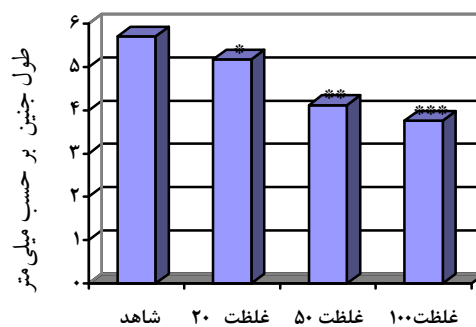
با انجام آزمایش ۹۶ ساعته برای تعیین غلظت کشنده ۵۰٪ از جنین‌ها، میزان این غلظت (LC<sub>50</sub>) بر جنین ماهی سفید دریای خزر حدود ۱۰۲/۴۱ میکرو گرم در لیتر تعیین شد. اما اثر سمیت جیوه بر جنین ماهی فلاندر در سال ۲۰۱۰ توسط Huang حدود ۴۸/۱ میکرو گرم در لیتر تعیین شد.

مطالعات اخیر نشان می‌دهد که اثر سمیت جیوه بر جنین‌های ماهی سفید بیشتر از میزان LC<sub>50</sub> در جنین ماهی فلاندر است. همچنین میزان سمیت کلرید جیوه بر ماهی *Orangerthroat (Etheostoma spetabile)* در *darter* حدود ۶۴/۵ میکرو گرم در لیتر تعیین شد، که از میزان سمیت کلرید جیوه بر جنین ماهی سفید کمتر است. میزان سمیت کلرید جیوه بر ماهی *Kill fish (Fundulus hetroclitus)* حدود ۶۷/۴ میکرو گرم در لیتر است (Sharp and Neff, 1992). به طوری که از مقدار LC<sub>50</sub> ماهی *(Paralichthys olivaceus)* بیشتر و از ماهی سفید کمتر است. این تفاوت در نتایج می‌تواند مربوط به کیفیت مواد مصرفی و روش‌های آزمایشگاهی متفاوت باشد در تحقیق حاضر اثر LC<sub>50</sub> 96<sup>h</sup> برای جنین‌های ماهی سفید حدود ۱۰۲/۴۱ میکرو گرم در لیتر است و اثر این سم بر روی

نتایج آزمون تشخیصی LSD نشان می‌دهد که میزان ناهنجاری در غلظت‌های ۲۰ و شاهد یکسان و میزان ناهنجاری در این گروه‌ها متفاوت از میزان ناهنجاری در غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ است.

### نتایج حاصل از بررسی طول جنین

میانگین طول جنین‌ها در تیمار شاهد ۵/۷۱ میلی‌متر تعیین شد و در تیمار ۲۰ میکرو گرم در لیتر ۵/۱۸ میلی‌متر و اندازه طول جنین‌های تیمار ۵۰ میکرو گرم در لیتر ۴/۱۲ میلی‌متر اندازه‌گیری شد. عدد اندازه‌ی طول جنین‌های تیمار ۱۰۰ میکرو گرم در لیتر برابر ۳/۷۶ میلی‌متر ثبت شد. با مقایسه اندازه‌های به دست آمده، بین طول جنین‌های شاهد و جنین‌های موجود در غلظت ۲۰ میکرو گرم در لیتر کلرید جیوه در روز ۷ جنینی، تفاوت قابل توجهی وجود ندارد.



شکل ۱۲: رابطه اندازه طول جنین‌های ماهی سفید در روز ۷ جنینی باغلظت

### بحث

آلودگی محیط زیست، یکی از مسائل متداول در دنیا است که، فلزات سنگین از موارد بسیار مهم این آلودگی به شمار می‌رود. پیشرفت‌های صنعتی منجر به

(Weis and Weis, 1977). نتایج تحقیق حاضر نیز مطالعات فوق را تایید می‌کند.

در سال ۱۹۷۷، Weis و Weis تاثیرات نامطلوب کلرید جیوه را بر اندام‌های ماهی *Fundulus heteroclitus* مورد بررسی قرار داد. در این تحقیق غلظت ۱mg/dm<sup>3</sup> کلرید جیوه سبب، ناهنجاری‌های ۱- عارضه Cyclopia ۲- بد شکلی جمجمه و سیستم اسکلتی ۳- ناهنجاری سیستم قلبی-عروقی شده که نتایج این مطالعه مشابه نتایج تحقیق حاضر می‌باشد.

در تحقیقی Samson و Shenker در سال ۲۰۰۰ اثرات سمی کلرید جیوه را بر اندام‌های جنین ماهی گورخری بررسی کردند. در این آزمایش، بدفرمی ستون مهره‌ها و خمیدگی انتهای دم در جنین‌هایی که در معرض ۳۰µg کلرید متیل جیوه (CH<sub>3</sub>HgCl) قرار داشتند به اثبات رسید. نتایج این مطالعه مشابه نتایج تحقیق حاضر می‌باشد.

بد شکلی در ستون فقرات و تغییر شکل در آرواره‌های جنین ماهی (*Pimephales peroelas*) وقتی در معرض ۲۵µg جیوه قرار می‌گیرد، ظاهر می‌شود. محقق علت این ناهنجاری را ایراد در میوتوم‌ها اعلام کرده است (Devlin, 2008).

تحقیقی در سال ۱۹۷۵ توسط Heisinger و Green انجام شد. در این آزمایش لاروهای تکامل یافته ماهی (*Oryzias latipes*) در آب‌های جیوه‌دار بدنی شبیه حرف C داشته و قادر به حرکت باله دمی نبودند. نتایج این مطالعه مشابه نتایج تحقیق بر جنین‌های ۲۰ میکروگرم در لیتر مطالعه حاضر می‌باشد.

در بیشتر جنین‌های در معرض فلزات سنگین عارضه آنورمالی در اسکلت بدن و سردیده می‌شود. مواد سنگین ممکن است سبب موازن اکتین شوند. این

لاروهای این ماهی حدود ۸۶ میکروگرم در لیتر گزارش شده است (شهریاری مقدم، ۱۳۸۷). این تقریباً هم اندازه با میزان LC<sub>50</sub> موثر بر لارو ماهی *Haddock (Melanogrammus aeglefinus)* حدود ۹۸ میکروگرم در لیتر (US EPA, 1982) و نسبت به LC<sub>50</sub> ماهی فلاندر ۴۶ میکروگرم در لیتر بیشتر است (Huang, 2010).

نتایج حاصل از مطالعه حاضر نشان می‌دهد، حساسیت جنین‌های ماهی سفید نسبت به غلظت‌های متفاوت جیوه کمتر از مرحله لارویی است. زیرا تخم در مرحله جنینی توسط پوشش غشاء جنین محافظت می‌شوند.

عواملی چون فلزات سنگین به عنوان آلودگی زیستی، تأثیراتی بر راندمان تکثیر و درصد بقا لاروها و مراحل تکوین و حتی درصد لقاح گذاشته است (شعبانی ۱۳۸۳؛ Samson and Cavas, 2008; Shenker, 2000; Perry, et al., 1988).

Samson و Shenker در سال ۲۰۰۰ تاثیرات نامطلوب جیوه را بر میزان مرگ و میر جنین *Danio rerio* مورد بررسی قرار داد. در این تحقیق مرگ ۲۰-۱۵٪ جنین‌ها در مدت ۸ ساعت اولیه پس از لقاح بوده است.

نتایج حاصل از تحقیق حاضر، تایید این موضوع که بیشترین مرگ و میر در ساعات اولیه بوده و با افزایش سن در جنین‌ها میزان مرگ و میر کاهش می‌یابد، را ثابت می‌کند.

همچنین قرار گرفتن در معرض جیوه حتی در غلظت‌های پایین می‌تواند ناهنجاری‌های ریختی گوناگون را در جنین‌ها و لاروهای ماهی افزایش بدهد

شده و سبب غیر فعال کردن مقدار زیادی از آنزیم‌ها و این ترکیبات بیولوژیکی می‌شود. جیوه و کادمیوم به پروتئین‌های اتصال کلسیم، مانند کالمود لین متصل شده و جایگزین کلسیم شده و سبب تخلیه یا آزاد کردن یون‌هایی، مانند کلسیم و فسفر و یا کاهش در میوزین و میوتین و یا هر دو که هر دو برای شکل‌گیری طبیعی اندام لازم‌اند، می‌شوند (Olivera, et al., 2002; Behr, 1993).

در مطالعات اخیر افزایش تعداد و شدت آنورمالی‌ها در جنین ماهی سفید با افزایش غلظت، رابطه مستقیم دارد. چنین گزارشاتی از دیگر فلزات مانند کادمیوم و Copper نیز ارائه شده است (Bagdonas and Vosyliene, 2006; Dave and Xian, 1991; Chow, 2003; Kapur and Yadav, 1982; Mori, 1979).

رشد ماهی اغلب به عنوان یکی از موارد حساس و مورد توجه در آزمایشات زهرشناسی (سمیت) به شمار می‌رود.

فلزات سنگین مراحل دتوکسی، (نابود شدن انرژی) را فعال می‌کند. بنابراین ماهی سمی شده به یون‌های Hg کم‌ترین انرژی برای رشد مصرف می‌کند. از دست دادن انرژی می‌تواند منجر به کاهش رشد شود (Huang, et al., 2010; Jezierska and witeska, 2001).

تحقیقی توسط Peterson و همکارانش در سال ۱۹۸۳ بر ماهی *Atlantic Salmon* انجام شد. تاثیر مخرب کلرید جیوه بر کاهش رشد جنین ماهی بررسی شد. محقق معتقد است که جیوه مانع مصرف زرده و در نتیجه سبب کاهش رشد می‌شود. همچنین تحقیقات مشابه توسط Nebeke و همکاران در سال ۱۹۷۴

تئوری در مورد اثر BAP بر اکتین به اثبات رسیده است (Kocan and Landot, 1984; Hannah, et al., 1982).

در سال ۱۹۷۷، Weis و Weis اثرات مخرب کلرید جیوه را بر ماهی *KilliFish* (*Fundulus heteroclitus*) بررسی کرد. در این آزمایش عارضه سیکلویا در چشم اثبات شد. تحقیقی دیگر در سال ۱۹۷۵ با هدف تاثیر کلرید جیوه بر ماهی *heteroclitus F.* انجام شد. در این آزمایش جنین‌هایی با چشم و سر ناقص مشاهده شدند.

تحقیقی در سال ۱۹۷۶ توسط Westernhagen و همکاران انجام شد. در این آزمایش جنین‌های ماهی *C.harengus* موجود در جیوه، دارای کیسه زرده بزرگتری نسبت به شاهد بودند. فلزات سنگین از جمله کادمیوم و جیوه مانع استفاده جنین از مواد داخل کیسه زرده می‌شود. بنابراین در این جنین‌ها کیسه زرده بزرگتر و رشد جنین بسیار کمتر از شاهد است.

در مطالعه اخیر بدریختی اندامی نظیر تغییر شکل ستون فقرات جنین در تخم و پیچش و انحناء دم و یا عدم تشکیل دم، کرانیوسفالی (تخریب سر)، ادم کیسه زرده و ناهنجاری در تشکیل عدسی و نکروتیت شدید در سلول خاکستری در چشم جنین‌ها دیده شد. بدشکلی ستون فقرات و بدخلقتی دم از بیشترین نوع آنورمالی در اندام‌ها بود. تغییر شکل ستون فقرات به عنوان یکی از رفتارهای پاتولوژیستی بین ماهی‌هایی که در نواحی آلوده به سیستم مواد شیمیایی شامل فلزات است بیان می‌شود (Hannes and Shenker, 2008; Cheng, et al., 2000).

یون‌های فلزی همچون Hg به گروه‌های سولفور (-SH) پروتئین‌هایی چون سیستئین و گلو تاتیون متصل

### سپاسگزاری

از پرسنل محترم مرکز تکثیر و بازسازی آبزیان شهید رجایی ساری و سایر دوستانی که در اجرای این پروژه ما را همراهی کردند نهایت سپاس را داریم.

### منابع

۱. بهزادی، ص.، ۱۳۷۰. مطالعات رشد و نمو جنین ماهی سفید. پایان‌نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، ۱۴۰ ص. ص ۱۵-۲۲.
۲. شعبانی، ش.، ۱۳۸۳. بررسی اندازه‌گیری تاثیر فلزات سنگین بر روی عملکرد فیزیولوژیک کلیه‌ی ماهیان استخوانی، پایان‌نامه کارشناسی ارشد دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، ص ۱۲-۱۴.
۳. شهریاری مقدم، م.، ۱۳۸۷. اثرات هیستوپاتولوژیک جیوه غیر آلی محلول در آب بر آبشش ماهی سفید در غلظت LC50، دومین همایش مهندسی محیط زیست.
۴. ناجی، ط.، ۱۳۸۵. تعیین LC ۵۰ کلرید کبالت در ماهی کپور معمولی (*Carpio Cyprinus*)، مجله علوم و تکنولوژی محیط زیست، جلد ۱۹، ص ۲۳ - ۳۱.
5. Arabi, M., 2004. Analyses of impact of metal ion contamination on carp (*Cyprinus carpio* L.) gill cell suspensions, *Biol. Trace Elem. Res.* 100, pp. 229-245.
6. Bagdonas E., Vosyliene, M. Z., (2006), A study of toxicity and genotoxicity of copper, zinc and their mixture to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Biologija (Vilnius)* 1, pp.8-13
7. Behra. R., 1993. In vitro effects of cadmium zinc and lead on calmodulin-dependent actions in *Oncorhynchus*

و Halter و Johnson در همان سال انجام شد، که نتایج به دست آمده مشابه با تحقیق انجام شده است. در تحقیق Blunt و Hodson در سال 1978 تاثیر نامطلوب جیوه را بر میزان رشد جنین ماهی قزل‌آلا بررسی کردند. در این آزمایش بیشتر جنین‌ها رشد کمی داشته و آسیب اسکلتی نیز دیده شد. محقق علت این ناهنجاری را اثر کلرید جیوه بر ممانعت از استفاده جنین از مواد کیسه زرده بیان کرده است.

جنین ماهی در حال رشد انرژی را به رشد و تشکیل اندام‌های فیزیولوژی اختصاص می‌دهد. وقتی جنین با افزایش هزینه انرژی توسط مواد مخرب رو برو می‌شود، میزان انرژی را که مربوط به رشد است را کاهش می‌دهد و این دقیقاً شبیه یک هموستازی است (Houck, 2004). نتایج حاصل از مطالعات، مشابه تحقیق حاضر است.

به عنوان نتیجه‌گیری کلی می‌توان بیان کرد که میزان LC50 برای جنین ماهی سفید ۱۰۲/۴۱ میکروگرم در لیتر تعیین شد و در غلظت‌های مورد مطالعه (۲۰-۵۰-۱۰۰ ppb) آسیب‌های مورفولوژی و کاهش رشد دیده شد که در غلظت ۲۰ میکروگرم کمترین مرگ و میر و ناهنجاری مشاهده شد که با افزایش دوز شدت می‌یابند.

در تحقیق میزان جیوه در آب دریای خزر ۴/۵ ppb اندازه‌گیری شد (بهزادی، ۱۳۷۰). این میزان کمتر از اندازه جیوه در تیمار پایین تحقیق حاضر ۲۰ ppb است بنابراین می‌توان گفت که گرچه وجود این میزان جیوه در آب دریای خزر در درازمدت برای ماهیان سفید بی‌تأثیر نیست اما حد آسیب‌های مورفولوژی ایجاد شده می‌تواند بسیار ناچیز باشد.

- mykiss, *Mytilus* sp and *Chlamydomonas reinhardtii*. *Arch Environ Contam Toxicol* 24, pp. 21–27.
8. Coad, B.w., 2000. Criteria for assessing the conseration status of taxas applied to Iranian fresh waterfishes *biologia* , Bratislava 55, pp. 539-557.
  9. Cavas, T., 2008. In vivo genotoxicity of mercury chloride and lead acetate: micronucleus test on acridine orange stained fish cells. *Food Chem Toxicol* 46, pp. 352–358.
  10. Chow, ESH., Cheng, SH., 2003. Cadmium affects muscle type development and axon growth in zebrafish embryonic mitogenesis. *Toxicol. Sci* 73, pp. 149–159.
  11. Cheng, SH., Chan, PK., 2000. Cellular and molecular Basis of cadmium-induced deformities in zebra fish embryos. *Environ Toxicol Chem* 19, pp. 3024–3031.
  12. Dave, G., Xian, R., 1991. Toxicity of mercury, copper, nickel, lead, and cobalt to embryos and larvae of zebra, *Environ Toxicol Chem* 12, pp. 186-192.
  13. Devlin, EW., 2006. Acute toxicity, uptake and histopathology of aqueous methyl mercury to fathead minnow embryos . *Ecotoxicol* 15, pp. 97–110.
  14. Diagonanolin, V; Farhang, M; Ghazi-Khansari, M., and Jafarzadeh, N., 2004. Heavy metals (Ni, Cr, Cu) in the Karoon Waterway river, Iran. *Aquatic Toxicology*. 50, PP. 63-68.
  15. Guilherme, M., Válega, M.E. Pereira, M.A. Santos and M. Pacheco b., 2008. Erythrocytic nuclear abnormalities in wild and caged fish (*Liza aurata*) along an environmental mercury contamination gradient, *Ecotoxicol. Environ* 70, pp. 411–421.
  16. Hannah, J.B., Hose, J.E., Landolt, M.L., Miller, B.S., Felton, S.P., and Iwaoka, W.T. 1982. Benzo (a) pyrene induced morphologic and developmental abnormalities in rainbow trout. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 11, pp. 727-734
  17. Hannes, R., Shenker, J., 2008. Acute lethal and teratogenic effects of tributyltin chloride and copper chloride on mahi mahi (*Coryphaena hippurus*) eggs and larvae, *Environ. Toxicol. Chem.* 27, pp. 2131–2135
  18. Halter, M.T., and Johnson, H.E., 1974. Acute toxicities of a polychlorinated biphenyl (PCB) AND DDT, alone and in combination, to early life stages of coho salmon, *Fish, Res. Board Can.* 31, pp. 1543-1547.
  19. Heath, A. C., 1995. "Water pollution and fish physiology" 2nd Edition Lewis, Boca raton, FL. pp. 425-463.
  20. Heisinger, JF., Green, W., 1975. Mercuric chloride uptake by eggs of the ricefish and resulting teratogenic effects. *Bull Environ Contam Toxicol* 14, pp. 665–673
  21. Hodson, PV., Blunt, BR., Spry, DJ., 1978. chronic toxicity of water-borne and dietary lead to rainbow trout (*Salmo gairdneri*) in lake Ontario water. *Water Res* 12, pp. 869–878.
  22. Houck, A., Cech, J., 2004. Effect of dietary methylmercury on juvenile Sacramento blackfish bioenergetics, *Aquat toxicol* 69, pp. 107-123
  23. Huang, L., Cao, Z.J., Ye, X.B., 2010. Antioxidative responses and bioaccumulation in Japanese flounder larvae and juveniles under chronic mercury exposure, *Comp. Biochem. Physiol. Toxicol.* 152, pp. 99–106.
  24. Jezierska, B., Witeska, M., 2001. Metal Toxicity to Fish. University of Podlasie Publisher, Siedlce, pp. 318-323.
  25. Kapur K, Yadav NA., (1982). the effects of certain heavy metals salts on the development of eggs in common carp, *Cyprinus Carpio* var. communis. *Acta Hydrochim Hydrobiol* 10, pp. 517–522.
  26. Kocan, R. M., Landolt, M. L., 1984. Alterations in patterns of excretion and other metabolic functions in developing fish embryos exposed to benzo(a)pyrene. *Helgol. Meeresunters.* 37, pp. 493-504.
  27. Mori, K., 1979. Effects of Hg and Cd upon the eggs and fry of 'goldfish' *Carassius auratus* (Linnaeus). *Bull Fac Fish Univ Mie* 6, pp. 173–180.
  28. Oliveira Ribeiro, C. A., Torres, R. F., 1995. "Acute effects evaluation of inorganic mercury on epidermis of

- Trichomycterus brasiliensis" Ecotoxicol. Environ 32, pp. 260–266.
29. Oliveira Ribeiro, C. A., Belger, E., Pelletier, E. and Rouleau C., 2002. "Histopathological evidence of inorganic mercury and methyl mercury toxicity in the arctic charr ( *Salvelinus alpinus*)" Environmental Research, 90, pp. 217-223.
  30. Perry, DM., Weis, J., Weis, P., 1988. Cytogenetic effects of methylmercury in embryos of killifish, *Fundulus heteroclitus*. Arch Environ Contam Toxicol 17, pp. 569–574.
  31. Peterson, R.H., and martin –Robichaud, D.J., 1983. Embryo movements of Atlantic salmon (*salmo salar*) as influenced by pH, temperature and state of development. Fish. Aquat. 40, pp. 777-782
  32. Samson, JC., Shenker, J., 2000. The teratogenic effects of methylmercury on early development of the zebrafish *Danio rerio*. Aquat Toxicol 48, pp. 343–354.
  33. Sharp, J.R., Neff, J.M., 1992. The toxicity of mercuric chloride and methylmercuric chloride to *Fundulus heteroclitus* embryos in relation to exposure conditions, Environ. Biol. Fish. 7, pp. 277–284.
  34. Verlecar, X.N., Jena, K.B., 2008. Modulation of antioxidant defences in digestive gland of *Perna viridis* (L.), on mercury exposures, Chemosphere. 71, pp. 77-85.
  35. Westernhagen, H., 1970. Erbrüung der Eier vom Dorsch (*Gadus morhua*), flunfder (*Pleuronectes flesus*) and Scholle (*Pleuronectes platesa*) unter kombinierten Temperatur und Salzgehaltsbedingungen. Helgol. Wiss. Meeresunters. 21, pp. 21-102.
  36. Weis, J.S., Weis, P., 1977. Effects of heavy metals on development of the killifish, *Fundulus heteroclitus*. J Fish 11, PP. 49–54.